

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 2 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390175

研究課題名(和文) アルコール性関連死における免疫応答攪乱の分子機構と臓器連関

研究課題名(英文) Role of disturbance of immune response in alcohol-related death

## 研究代表者

松本 博志 (MATSUMOTO, HIROSHI)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60263092

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：アルコール関連死が免疫攪乱によって生じるという仮説のもとに行った研究である。突然死モデル、頭部外傷モデル、大腿骨頭壊死モデル、熱中症モデル等を作成して解析を行った。いずれのモデルにおいても自然免疫機構の攪乱が生じていること、それが通常の生体防御に相当する経路の活性を抑制していること、それらが臓器死や個体死等の死因等の現象にかかわっていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We hypothesized that alcohol-related death can be caused by disturbance of immune system. We performed a variety of model rats such as a sudden death model, brain contusion model, osteonecrosis of femoral head, hyperthermia and so on. In all the model rats, we confirmed the disturbance of immune system, especially innate immune system via TLR4, TLR7, or TLR9. In femoral head osteonecrosis model, we found TRIM21 can be strongly related to promote the pathogenesis.

研究分野：アルコール医学 死因究明学

キーワード：アルコール関連死 突然死 大腿骨頭壊死 自然免疫 免疫攪乱 TLR4 TLR7 TLR9

1. 研究開始当初の背景

アルコールは法医実務で死亡者の体内から少なからず検出されるが、死因との関連は明らかではない。私たちはアルコール摂取によって自然免疫シグナリングの生体防御系の破綻が死に繋がるとの仮説を下に実験を行ってきた。飲酒者の頭部外傷後死亡を解明するためにアルコール投与後に脳挫傷を作成したモデルにおいては下記の図1に示したように24時間後に半数が死亡した。

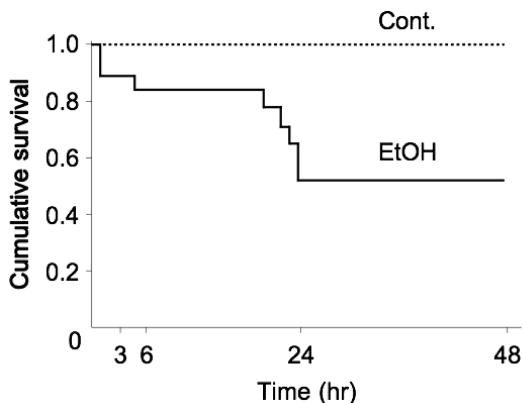


図1 アルコール前処置ラットの脳挫傷後の生存曲線 . P < 0.001

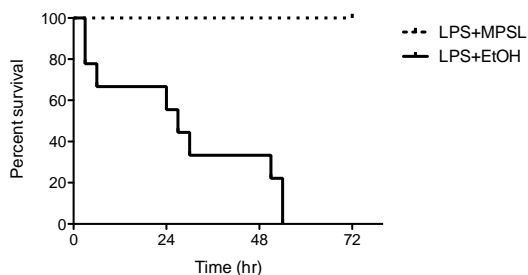


図2 LPS 処置ラットのアルコール投与後の生存曲線 . P < 0.001

このモデルでは、脳浮腫がアルコール前処置群で6時間後から有意に上昇すること、脳挫傷後3時間に抗酸化剤を処置すると脳浮腫が軽減しすべて生存することを明らかにした(J Neurotrauma, 2009)。この抗酸化剤については現在臨床研究倫理審査委員会の承認を得て自主臨床研究を行っている。また、この実験では免疫応答が乏しいことも明らかにし、さらに転写制御因子 NF-kappaB で誘導される AQP4 がその浮腫形成に係わっていることも明らかにした。一方、自然免疫系を攪乱させるため少量の LPS を投与するモデルを作成し、アルコールを投与したところ3日以内に全ての動物が死亡した。このモデルにおいてはアルコール摂取後に血中の endotoxin および IL-1 の上昇を認めてはいるものの、心・肝・腎において TNF 等のサイトカインの mRNA の上昇は来していなかった。アルコールの代わりに免疫抑制剤の一つである methylprednisolone を投与すると

全例死亡はしないものの、大腿骨頭壊死を起こすことを見出し、これは世界で初めてのステロイド性骨頭壊死ラットモデルとなった (Rheumatology, 2009)。このモデルでは、脂肪肝を有していること、IL-2 の上昇等を見出し、肝臓とヘルパーT細胞の役割が示唆された。さらに、このモデルにおいて抗酸化剤あるいは NO 合成酵素阻害剤を投与すると投与時期によって骨頭壊死の発生頻度に違いが出ること、生成過程に IL-17、IFN が関与していることも明らかにしている。また、アルコール性骨頭壊死モデルも世界で初めて確立し同様に IL-17、IFN- の上昇という同様の知見が得られている。つまり、TLR シグナリング、特に IRF が関与することが示唆された。一方、私たちは以前脂肪性肝障害の発生機序において TLR シグナリングの Myd88 依存経路が重要であることを明らかにしている。また、このモデルでは肝臓内の長鎖脂肪酸合成酵素 CPT-II の活性が低下していることが知られており、この CPT-II の遺伝的多型は急性脳症の発症に関連していることが最近報告された (Human Mutat, 2008)。

また、TLR4 シグナリングの下流域に iPS 細胞作成の際に必要なとされている遺伝子の一つである NANOG があることも報告されている (PNAS, 2009)。最近、viperin というタンパクが脂肪滴と結合し TLR7 と TLR9 からのシグナル系である IRF7 エンドゾームで MyD88 と IRF7 と結合し、Type I IFN を活性化させることも報告された (Immunity, 2011)。これらについては、s-adenosyl methionine 結合タンパクの欠損マウス(脂肪肝形成)で明らかにされている。また、IRF3, 5, 7 の活性制御にデスドメインに結合するタンパクである TRIM が関与していることも報告されている (JBC, 2011)。一方、血中にあるエクソゾームにも免疫系分子等が含まれていて臓器間輸送に関与していることも報告されていることが報告されている (Nat Rev Immunol, 2009)。

したがって、以上の知見を総合すると、アルコール関連死の病態機構に自然免疫系のシグナリング、特に IRF を中心とする制御系が寄与していること、それにエンドゾームや脂肪滴が関与していることが明らかになったものの、これらの破綻が死につながる、脂肪肝と他の臓器間との関連等については、未だ明らかではなかった。

2. 研究の目的

飲酒者の急死についてはその死亡機序が未だ明らかではない。私たちは、動物モデルで自然免疫を攪乱させた後アルコールを投与すると死亡することを見出し、それについて解析を進めてきた。自然免疫を中心とする免疫応答の攪乱が死因に関与することを明らかにしたものの、その免疫応答の攪乱がなぜ死亡に繋がるのかの臓器間分子機構について

ては未だ不明である。この研究では、アルコールにより免疫応答の攪乱が異常な臓器間相互作用を生じているとの仮説の下で、エクソゾームを抽出しその内部に存在する自然免疫系の構成分子を同定して、その標的臓器でのシグナルネットワークを解析し、死亡機序の一端を明らかにすることを目的とするとともに、急性脳症や飢餓死等、脂肪性肝障害を伴う死因への関与も検討する。

### 3. 研究の方法

1. 使用する動物は、Wistar 系ラット、C57BL/6J マウス、すでに飼育中の TLR4(-/-) マウス、TLR9(-/-) マウス、Myd88 (-/-) マウスである。

2. アルコール性肝障害モデルについては既報 (Hepatology, 1984) に従って、アルコール液体飼料で 4 週間 pair-feeding で作成する。

3. アルコール性急死モデルについては既報 (Am J Physiol, 2011) に従って、LPS (1 mg/kg) を 24 時間間隔で 2 回投与した後、EtOH を 0, 2, 4, 6 g/kg を投与して以下経時的に血液と臓器を採取する。血液からは、既報 (Nat Cell Biol) に従って現有機器である超高速遠心機を用いて密度勾配法にてエンドゾームを抽出する。

4. アルコール性大腿骨頭壊死モデルについては既報 (投稿中) にしたがって作成する間、経時的に大腿骨頭部の組織切片を作成して、TLR 系、IRF 系、樹状細胞、破骨細胞を免疫組織染色および in situ hybridization で mRNA を検出する (松本、館田)。また、血液からは上記と同様にエクソゾームを抽出する。

5. 各モデルにおいて、血中のケモカイン・サイトカイン・アディポカイン・trypsin・MMP 等を現有機器である Luminex で multiplex に解析する。また、心臓、肝臓、腎臓においてすでに教室で確立した方法であるタンパク抽出、RNA 抽出、免疫組織染色、in situ hybridization 等を行って免疫応答攪乱現象を検出する。mRNA 発現および miRNA の定量については、既報にしたがって、現有機器の Opticon および Chromo4 のリアルタイム PCR 機器で行った。

6. IRF3, IRF7, TRIM21, TLR7 あるは TLR9 等を蛍光タンパクで標識し臓器特異的に発現するトランスジェニック動物を ZEN テクノロジーを用いて作成し、アルコール性肝障害モデル、アルコール性大腿骨頭壊死モデル、アルコール性急死モデルを作成して、そのタンパクの役割を検討した。

7. エンドゾームの抽出とタンパク解析を行って、上記のモデル動物における含有タンパクの確認を行った。

8. その蛍光標識したタンパクがどの臓器に分布しているかを免疫組織学的に検出し、その臓器障害との関係を細胞間の連関を同様に検討した。

### 4. 研究成果

アルコール性大腿骨頭壊死、熱中症、急性脳症について動物モデルを確立し、これらを中心に解析を進めた。アルコール性大腿骨頭壊死モデルは世界で初めて確立できた。これにおいては、NF-kappaB および IRF7 の活性上昇が認められたのに対し、IRF3 の活性上昇はなく、自然免疫機構においては MyD88 依存性経路の活性化がその病態に関与していることを明らかにした。一方、以前確立したステロイド性大腿骨頭壊死モデルにおいて IRF3 および IRF7 の活性上昇とタイプ I のインターフェロンの上昇を認めていることは、病態が異なることが明らかとなった。このことはアルコールが NF-kappaB 活性を上昇させる働きがある一方、ステロイドは抑制する働きがあることに起因している。熱中症モデルについては脳スライスモデルを使用して中枢神経系に及ぼす影響を検討したが、HSP27 等の HSP の上昇と TRV1 のバニラ受容体の上昇を認めた。これらは熱中症モデルの治療のポイントになる可能性がある。自然免疫系については、TNF や IL-1 は低下する傾向を見せ、生体防御が低下していることも明らかにした。また初代心筋細胞培養も使用して心機能に及ぼす影響も検討した。その結果、CX43 の局在と発現に影響を及ぼしていることが明らかになり、熱負荷時の不整脈の発生と死因に関する一端を明らかにした。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 13 件)

1. Okazaki S, Nagoya S, **Matsumoto H**, Mizuo K, Shimizu J, Watanabe S, Inoue H, Yamashita T. [TLR4 stimulation and corticosteroid interactively induce osteonecrosis of the femoral head in rat.](#) J Orthop Res. 2016 Feb;34(2):342-5. doi: 10.1002/jor.23008. Epub 2015 Aug 19.

2. Okazaki S, Nagoya S, **Matsumoto H**, Mizuo K, Sasaki M, Watanabe S, Yamashita T, Inoue H. [Development of non-traumatic osteonecrosis of the femoral head requires toll-like receptor 7 and 9 stimulations and is boosted by repression on nuclear factor kappa B in rats.](#) Lab Invest. 2015 Jan;95(1):92-9. doi: 10.1038/labinvest.2014.134. Epub 2014 Nov 10.

3. **Katada R**, Sugimoto K, Yoshida M, **Matsumoto H**. [Ethanol increases astrocyte aquaporin-4 expression under hyper-sodium condition.](#) Nihon Arukoru Yakubutsu Igakkai Zasshi. 2014 Jun;49(3):188-94.

4. Okazaki S, Nagoya S, Tateda K, Katada

R, Mizuo K, Watanabe S, Yamashita T, **Matsumoto H.** [Experimental rat model for alcohol-induced osteonecrosis of the femoral head.](#) Int J Exp Pathol. 2013 Oct;94(5):312-9. doi: 10.1111/iep.12035.

5. Hyodoh H, Watanabe S, **Katada R**, Hyodoh K, **Matsumoto H.** [Postmortem computed tomography lung findings in fatal of hypothermia.](#) Forensic Sci Int. 2013 Sep 10;231(1-3):190-4. doi: 10.1016/j.forsciint.2013.05.011. Epub 2013 Jun 8.

6. Okazaki S, Nagoya S, Tateda K, Katada R, Mizuo K, Watanabe S, Yamashita T, **Matsumoto H.** [Weight bearing does not contribute to the development of osteonecrosis of the femoral head.](#) Int J Exp Pathol. 2012 Dec;93(6):458-62. doi: 10.1111/j.1365-2613.2012.00836.x. Epub 2012 Oct 18.

7. Mizuo K, Katada R, Okazaki S, Tateda K, Watanabe S, **Matsumoto H.** [Epigenetic regulation of MIR-124 under ethanol dependence and withdrawal.](#) Nihon Arukoru Yakubutsu Igakkai Zasshi. 2012 Jun;47(3):155-63.

8. Tateda K, Okazaki S, Nagoya S, Katada R, Mizuo K, Watanabe S, Yamashita T, **Matsumoto H.** [The suppression of TRIM21 and the accumulation of IFN- \$\alpha\$  play crucial roles in the pathogenesis of osteonecrosis of the femoral head.](#) Lab Invest. 2012 Sep;92(9):1318-29. doi: 10.1038/labinvest.2012.89. Epub 2012 Jul 23.

9. Katada R, Watanabe S, Ishizaka A, Mizuo K, Okazaki S, **Matsumoto H.** [Ethanol-induced hyponatremia augments brain edema after traumatic brain injury.](#) Nihon Arukoru Yakubutsu Igakkai Zasshi. 2012 Apr;47(2):68-74.

8. Okazaki S, Nagoya S, Yamamoto M, Tateda K, Takahashi H, Yamashita T, **Matsumoto H.** [High risk of osteonecrosis of the femoral head in autoimmune disease patients showing no immediate increase in hepatic enzyme under steroid therapy.](#) Rheumatol Int. 2013 Jan;33(1):51-5. doi: 10.1007/s00296-011-2295-y. Epub 2012 Jan 4.

9. Katada R, Nishitani Y, Honmou O, Mizuo K, Okazaki S, Tateda K, Watanabe S, **Matsumoto H.** [Expression of aquaporin-4 augments cytotoxic brain edema after traumatic brain injury during acute ethanol exposure.](#) Am J Pathol. 2012 Jan;180(1):17-23. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.09.011. Epub 2011 Nov 1.

10. **松本 博志**【アルコール性臓器障害】 飲

酒による外因死 アルコールによる細胞障害増悪の機序.細胞(1346-7557)47 巻 14 号 Page697-700(2015.12)

11. 岡崎 俊一郎, 名越 智, 佐々木 幹人, 渡邊 智, 山下 敏彦, 松本 博志. ステロイド性大腿骨頭壊死症発生における自然免疫シグナル伝達. 東日本整形災害外科学会雑誌(1342-7784)25 巻 1 号 Page73-76(2013.03)

12. **松本博志**. 【アルコール関連問題とその対策:進歩と展望】 アルコールにまつわる諸問題 アルコールと暴力・虐待. Progress in Medicine (0287-3648)33 巻 4 号 Page905-910(2013.04).

13. 片田 竜一, 水尾 圭祐, 岡崎 俊一郎, 舘田 健児, 渡邊 智, 松本 博志. アルコールによる脳浮腫増悪に及ぼす Na<sup>+</sup>および AQP4 の影響. アルコールと医学生物学 31 巻 Page51-53(2012.10)

〔学会発表〕(計 100 件)

〔図書〕(計 1 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホ ム ペ ー ジ 等 :  
<http://www.legal.med.osaka-u.ac.jp>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松本 博志 (MATSUMOTO, Hiroshi)

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 60263092

### (2) 研究分担者

杉本 香奈 (SUGIMOTO, Kana)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 00581034